

## РАВНОВЕСНАЯ ДИНАМИКА БЕЛКА. ИЗУЧЕНИЕ СОБСТВЕННОЙ ФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ МЕЛИТТИНА

*В работе в широком температурном диапазоне детально изучена структурно-динамическая организация молекулы мелиттина. Для тетрамерного мелиттина наблюдаемые при низких температурах спектральные изменения собственной флюоресценции связаны не с изменением подвижности диполей, как при высоких температурах, а с диссоциацией. Уточнены полученные ранее значения параметров дипольно-ориентационной подвижности окружения триптофанила. Показано, что величина энергии активации равновесных структурных флуктуаций в тетрамерном мелиттине, позволяющих взаимодействовать с триптофанолом как внешнему тушению, так и тушащим группам самого белка, составляет 10—15 кДж/моль. Энергия активации реориентации внутренних дипольных групп мелиттина 30 кДж/моль.*

**Введение.** Литический пептид пчелиного яда мелиттин, состоящий из 26 аминокислотных остатков, является одним из популярнейших объектов в исследовании белковой динамики. Это связано в первую очередь с относительной простотой и изученностью его статической структуры. Флюоресценция единственного остатка ароматической аминокислоты (триптофанил-19) чувствительна к конформационному состоянию молекулы. При низкой ионной силе и малых концентрациях мелиттин представляет собой неупорядоченный статистический клубок. При повышении ионной силы он агрегирует в тетрамер с высоким содержанием  $\alpha$ -спиралей [1].

Результаты, полученные в предыдущих работах с помощью методов красного краевого возбуждения стационарной флюоресценции Трп-19 [2, 3] и спектроскопии с временным разрешением [4, 5], свидетельствуют о том, что область наносекундной подвижности структуры тетрамерного мелиттина лежит при температурах, выше комнатной. Это не соответствует выводам Е. А. Пермякова и Э. А. Бурштейна [6], сделанным на основании исследования ряда белков, о том, что наносекундная динамика характерна для системы связанная вода — белок только при низких температурах (ниже  $-20^{\circ}\text{C}$ ). Причина такого несоответствия остается непонятной: либо же в силу особенностей структуры мелиттина наблюдается смещение диапазона релаксаций, либо же в случае мелиттина имеются две группы диполей, подвижность которых попадает в наносекундный диапазон при разных температурах. Ответ на поставленный вопрос должно дать изучение низкотемпературной флюоресценции мелиттина.

В настоящей работе ставилась задача детального изучения структурно-динамической организации молекулы мелиттина в широком температурном диапазоне различными методами стационарной флюориметрии.

**Материалы и методы.** В работе использовали этиленгликоль, глицерин, KI, CsCl производства фирмы «Serva» (ФРГ), а также сахароза,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , бромсукцинимид — отечественного производства, квалификации не ниже хч.

Мелиттин, выделенный из пчелиного яда при помощи гель-фильтрации и ионообменной хроматографии [2], был любезно предоставлен Е. Г. Костржевской (Ин-т биохимии АН УССР).

Изучение мономерного мелиттина производили в 10 мМ HEPES-буфере, pH 7,4. При работе с тетрамерным мелиттином буфер содержал 2 М NaCl.

Спектры флюоресценции регистрировали на флюоресцентных спектрофотометрах Hitachi MPF-4 и Hitachi 650 (Япония) в режиме отношения сигналов. Спектральная ширина щели монохроматоров возбуждения и эмиссии составляла 1—3 нм. После монохроматора возбуждения размещался интерференционный фильтр, пропускающий свет только с длиной волны короче 320 нм.

В некоторых экспериментах для повышения чувствительности к небольшим изменениям положение спектра характеризовалось отношением интенсивностей флюоресценции на крыльях.

Измерение флюоресценции растворов производили из объема в кювете  $1 \times 1$  см. Для проведения низкотемпературных измерений была использована криоприставка с охлаждением парами азота в кювете круглого сечения диаметром 0,4 см. Температуру определяли с помощью термопары медь-константан, один конец которой помещали в жидкий азот.

При изучении тушения флюоресценции йодидом исследуемый раствор титровали 2-молярным раствором KI в том же буфере, что и образец, но содержащем 0,1 мМ  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , для предотвращения образования  $\text{I}_3$ . Флюоресценция в этих экспериментах возбуждалась на 290 нм. Расчет константы тушения флюоресценции ( $K_{sv}$ ) производили по уравнению:  $F_0/F = 1 + K_{sv}[I^-]$ , где  $F_0$  и  $F$  — интенсивности флюоресценции в отсутствие и в присутствии тушителя соответственно;  $[I^-]$  — концентрация йодида.

В работе использовали следующие обозначения:  $\tau_R$  — время дипольно-ориентационной релаксации;  $\tau_F$  — время жизни электронно-возбужденного состояния хромофора;  $E_a$  — энергия активации.

**Результаты и обсуждение.** Температурные зависимости спектров флюоресценции мелиттина. На рис. 1 представлены температурные зависимости положения спектра флюоресценции мелиттина при разных условиях возбуждения: в максимуме полосы поглощения (280 нм) и на длинноволновом краю (305, 310 нм).

Предыдущие исследования [3] показали, что высокотемпературные спектральные изменения флюоресценции Трп-19 в тетрамерном мелиттине (кривые 1, 3;  $t > 25^\circ\text{C}$ ) происходят не

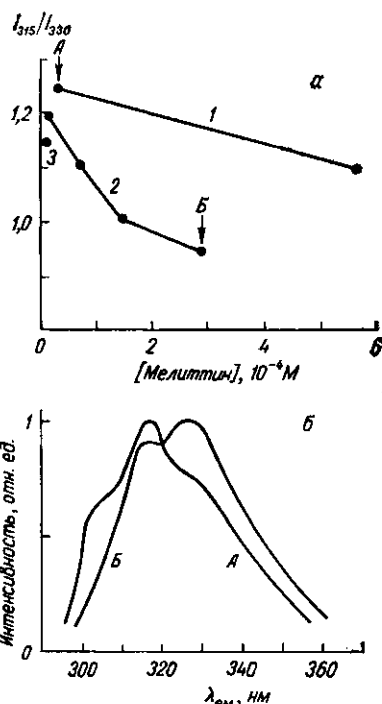
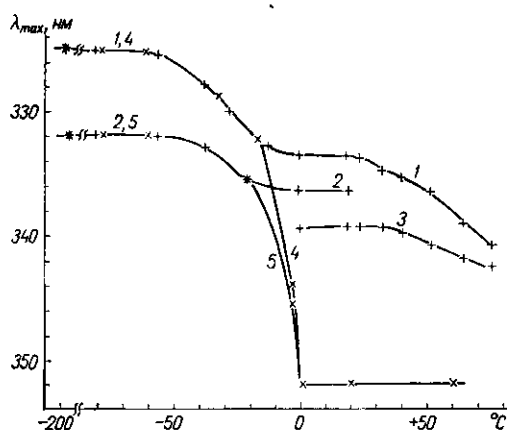


Рис. 1. Температурная зависимость максимума спектра флюоресценции мелиттина в 2 М NaCl (1—3) и в бессолевой среде (4, 5). Возбуждение 280 (1, 4), 305 (2, 5) и 310 нм (3). Концентрация мелиттина 10 мкМ

Fig. 1. Temperature dependence of melittin fluorescence spectrum peak in 2 M NaCl (1—3) and in salt-free medium (4, 5). Excitation is 280 (1, 4), 305 (2, 5) and 310 nm (3). Melittin concentration — 10  $\mu\text{M}$

Рис. 2. Низкотемпературная флюоресценция мелиттина,  $t = -196^\circ\text{C}$ : а — концентрационная зависимость отношения интенсивностей при длинах волн регистрации 315 и 330 нм (1 — бессолевая среда; 2 — 2 М NaCl; 3 — 3 М NaCl); б — спектры флюоресценции (обозначения А и Б соответствуют условиям, указанным на рис. 2, а)

Fig. 2. Low-temperature melittin fluorescence,  $t = -196^\circ\text{C}$ : а — concentration dependence of intensities ratio at wavelengths of recording 315 and 330 nm (1 — salt-free medium; 2 — 2 M NaCl; 3 — 3 M NaCl); б — fluorescence spectra (designations A and B correspond to conditions indicated in Fig. 2, а)

в результате каких-либо конформационных перестроек, а являются следствием проявления наносекундной дипольно-ориентационной релаксации окружения триптофанила в нативной структуре белка. Длинноволновое излучение и отсутствие краевого сдвига в случае мономерного

мелиттина (кривые 4, 5) в области положительных температур указывают на то, что триптофан экспонирован в быстрорелаксирующую водную фазу.

При замораживании спектры белка как в солевой (кривые 1, 2), так и в бессолевой (4, 5) среде сдвигаются в коротковолновую область, пока не достигают предельных значений при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Видно, что ниже  $-20^{\circ}\text{C}$  кривые с одинаковым возбуждением практически совпадают. Для выяснения природы наблюдаемого при замораживании перехода исследована концентрационная зависимость положения спектра флуоресценции при  $-196^{\circ}\text{C}$ . При этом использован более чувствительный к спектральным изменениям параметр — отношение интенсивностей на крыльях спектра ( $I_{315}/I_{330}$ ). Как видно из рис. 2, а, положение спектра зависит от ионной силы даже при малых концентрациях белка (для которых были получены зависимости, приведенные на рис. 1), а с увеличением концентрации эти различия увеличиваются. Чем выше концентрация белка и ионная сила, тем более длинноволновым становится спектр.

Эта картина напоминает хорошо изученный при высоких температурах переход мономер — тетрамер с той только разницей, что теперь при диссоциации наблюдается коротковолновый, а не длинноволновый сдвиг. Почему так происходит, становится ясно после анализа формы спектра мелиттина при  $-196^{\circ}\text{C}$  (рис. 2, б). Нетрудно видеть, что спектр может быть представлен суперпозицией двух классов триптофанилов ( $S$  и  $I$ , согласно классификации Э. А. Бурштейна [7]), соотношение между которыми меняется в зависимости от концентрации и ионной силы. При этом истинный тетрамер соответствует классу  $I$ , т. е. эксиплексу 1:2 (один триптофанил образует две водородные связи с окружающими группами) с замороженной дипольной релаксацией. Спектр же мономера ( $S$ ) — это спектр эксиплекса 1:1. По-видимому, вторая связь образовалась за счет взаимодействия с группой, принадлежащей другой полипептидной цепи мелиттина, либо с растворителем, если замораживался изначально мономерный белок.

Таким образом, в низкотемпературном переходе мономерного мелиттина можно выделить несколько этапов: замораживание дипольной реориентационной подвижности белковых групп и слабо связанной воды в окружении эксиплекса триптофанила 1:2 (начинается практически сразу же за замораживанием основной массы воды) и переход от эксиплекса 1:2 к эксиплексу 1:1 при дальнейшем замораживании. Граница между этими переходами невыражена.

Для тетрамерного мелиттина низкотемпературный переход оказывается связанным, по-видимому, не с замораживанием подвижности диполей, а только с диссоциацией. Следовательно, увеличение краевого сдвига в низкотемпературной области связано не с дальнейшим замедлением подвижности дипольных групп в окружении возбужденного триптофанила, а с фотоотбором хромофоров с существенно различной энергией основного состояния. В последнем случае подразумевается, что различия связаны не с различием ориентации одних и тех же дипольных групп в сольвате, а с тем, что в состав окружения разных триптофанилов входят различные белковые группы.

Полученный результат можно рассматривать как подтверждение того факта, что структура тетрамерного мелиттина обладает большой жесткостью, и диапазон наносекундных релаксаций оказывается смещенным в высокотемпературную область.

Количественный анализ времен дипольной ориентационной релаксации в окружении Трп-19. Поскольку все триптофанилы тетрамерного мелиттина находятся в идентичном окружении [3, 8], а спектральные изменения флуоресценции в области положительных температур не являются следствием тепловой денатурации [3], оказалось возможным проведение количественного расчета времени дипольной релаксации  $\tau_R$  [2, 3]. При этом было использовано уравнение, связывающее величины краевого сдвига флуоресценции с времен-

ными характеристиками подвижности и затухания свечения хромофора (метод расчета  $\tau_R$  описан в [9, 10]).

В настоящей работе использовано то же уравнение, однако по сравнению с опубликованными ранее вместо значений положения максимума спектра использованы значения положения центра тяжести, а также более точные значения времени жизни возбужденного состояния  $\tau_R$ , взятые из работы [5].

Результаты расчета времени дипольно-ориентационной динамики окружения триптофанила в структуре тетрамерного мелиттина представлены на рис. 3 в координатах Аррениуса. Линейность зависимости

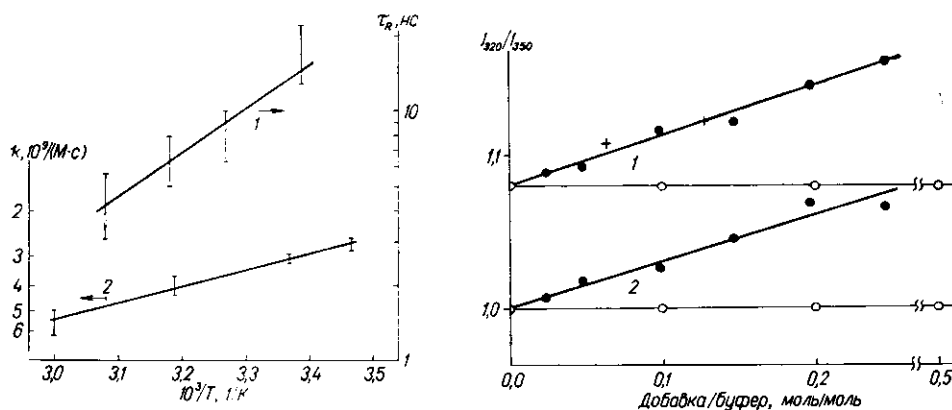


Рис. 3. Температурная зависимость времени дипольно-ориентационной релаксации окружения Трп-19 в тетрамерном мелиттине —  $\tau_R$  (1) и бимолекулярной константы тушения ионами  $\text{I}^-$  флуоресценции Трп-19 в тетрамерном мелиттине —  $k$  (2)

Fig. 3. Temperature dependence of time of dipole-orientation relaxation of Trp-19 in tetra-dimensional melittin —  $\tau_R$  (1) and bimolecular constant of Trp-19 fluorescence quenching by  $\text{I}^-$  ions in tetra-dimensional melittin —  $k$  (2)

Рис. 4. Зависимость отношения интенсивностей флуоресценции тетрамерного мелиттина при длинах волн 320 и 350 нм от молярного отношения добавляемого растворителя к исходному (водный буфер, содержащий 3,2 М NaCl): ● — глицерин, + — этиленгликоль, ○ — бессолевой буфер (контроль). Возбуждение флуоресценции: 280 (1) и 305 (2) нм

Fig. 4. Dependence of ratio of tetra-dimensional melittin fluorescence intensities at wavelengths 320 and 350 nm on molar ratio of the solvent added to the initial one (aquatic buffer containing 3.2 M NaCl): ● — glycerol, + — ethylene glycol, ○ — salt-free buffere (control). Fluorescence excitation: 280 nm (1) and 305 nm (2)

$\lg \tau_R$  от  $1/T$  свидетельствует в пользу активационного характера реориентационного движения. Величина энергии активации, определяемая по наклону аппроксимирующей прямой, составляет 30 кДж/моль.

Это уточненное значение меньше оценок, полученных в более ранних работах [2, 3] (что связано с вышеуказанными поправками расчета); однако оно больше величины  $E_a = 15$  кДж/моль, полученной из экспериментов с временным разрешением [5]. Наблюдавшиеся спектральные зависимости времени затухания флуоресценции позволили рассчитать времена релаксации спектра, оказавшиеся несколько меньшими, чем времена  $\tau_R$ , полученные методом краевого сдвига. Так, для 15 °C получено значение 10 нс [5], а экстраполяция из диапазона релаксаций на рис. 3 дает 20 нс. Возможно, объяснение такого расхождения следует искать в специфике разных методов определения параметров структурной релаксации окружения возбужденного хромофора. Так, метод краевого сдвига, если судить по модельным экспериментам [9, 10], дает завышенные в 2—3 раза значения  $\tau_R$ , однако полностью адекватен для определения  $E_a$ . Что касается метода, предложенного в работе [5], то его слабой стороной является необходимость подгонки сразу нескольких параметров, задающих спектральнозависимое затухание ( $\tau_F$ ), движение спектра ( $\tau_R$ ) и положение полностью отрелаксировавшего спектра.

Несомненно, потребуется больше подробных модельных экспериментов для выяснения соотношения точности и информативности этих методов. Вполне очевидно, метод краевого сдвига обладает тем важным преимуществом, что для полуколичественного анализа равновесной внутримолекулярной динамики белка не требуется сложной аппаратуры с временным разрешением. Не следует, однако, забывать, что, как показали низкотемпературные эксперименты на мелиттине, при использовании этого метода даже для качественной оценки динамики необходим контроль однородности основного состояния хромофоров даже в популяции молекул одотриптофанового белка.

*О возможном гомопереносе энергии в тетрамерном мелиттине.* Наряду с дипольной релаксацией одним из возможных объяснений движения спектров, разрешенных во времени в длинноволновую область, является безызлучательный перенос энергии от хромофоров с большей частотой излучения к хромофорам с меньшей. Существует теоретическая возможность осуществления такого переноса между триптофанилами тетрамерного мелиттина. При этом потеря энергии излучения будет происходить за счет преимущественного переноса от триптофанилов, слабее взаимодействующих с окружением, к сильнее взаимодействующим [11]. Наличие такого процесса может вносить погрешность в определение  $\tau_R$ , поэтому решение вопроса о межтриптофановом переносе энергии имеет принципиальное значение.

Известно, что триптофанилы в тетрамерном мелиттине могут быть необратимо модифицированы при помощи бромсукцинимидов. В результате образуется продукт, спектр поглощения которого смещен в длинноволновую область настолько, что на него происходит гетероперенос энергии возбуждения с других триптофанилов мелиттина [12]. Если такой перенос будет осуществляться селективно, т. е. преимущественно от субпопуляции триптофанилов с более длинноволновым излучением, то по мере модификации спектр немодифицированных триптофанилов должен сдвигаться в коротковолновую область. В результате экспериментальной проверки этого предположения нами установлено, что при падении интенсивности излучения тетрамерного мелиттина под действием возрастающих количеств бромсукцинимидов вплоть до 20 % от начальной интенсивности положение и форма спектра немодифицированных триптофанилов не изменяются (данные не представлены). Из этого следует, что в тетрамерном мелиттине межтриптофановый гомоперенос энергии либо вовсе не происходит, либо он носит чисто резонансный характер и не сопровождается потерей энергии. В последнем случае он не вносит погрешности в определение  $\tau_R$ , которое становится интегральной характеристикой динамики окружения всех хромофоров тетрамера, охваченных безызлучательным переносом энергии.

Возможным существованием миграции энергии возбуждения как между различными триптофанилами, так и между различными электронно-возбужденными состояниями одного хромофора ( ${}^1L_a$ — ${}^1L_b$ ) можно объяснить наличие быстрой деполяризации излучения [13]. Сами авторы связывали это с быстрым ограниченным вращением индольного кольца в структуре мелиттина, что противоречит нашим выводам о большой жесткости тетрамерного мелиттина.

*Тушение флуоресценции.* Исследование тушения флуоресценции тетрамерного мелиттина показало отсутствие тушения ионами цезия (константа тушения менее 0,001 л/м) во всем температурном диапазоне. Тушение анионным тушителем (йодидом), наоборот, было большим (таблица). Такие различия в характере тушения анионом и катионом определяются наличием по соседству с триптофаном кластера положительно заряженных групп. Сохранение линейности кривых тушения в координатах Штерна—Фольмера (данные не приведены), наблюдаемое при повышении температуры до 60 °С, свидетельствует о существовании единственной конформации белка при данной температуре.

Были рассчитаны значения бимолекулярных констант тушения

$k = K_{sv}/\tau_F$  [7], при этом использовались температурные зависимости  $\tau_F$  [5] и квантового выхода (для 60 °С) [2] (таблица). Температурная зависимость  $k$  в координатах Аррениуса имеет линейный характер (рис. 3, кривая 2), что можно рассматривать как свидетельство активационного характера тушения. Полученное значение энергии активации  $10 \pm 2$  кДж/моль совпадает со значениями, характерными для тушения флюоресценции белковыми группами, рассчитанными по температурным зависимостям квантового выхода ( $E_a = 15 \pm 5$  кДж/моль) [2] и времени жизни возбужденного состояния  $\tau_F$  ( $\sim 10$  кДж/моль) [5]. Эта величина совпадает также со значениями, полученными другими исследователями в экспериментах по тушению йодидом и акриламидом ряда одотриптофановых белков [14]. Последнее обстоятельство интересно тем, что константы Штерна — Фольмера для этих белков на порядок меньше, чем для мелиттина; и в отличие от мелиттина в исследованном температурном диапазоне (9–40 °С) спектральные изменения не наблюдались. По-видимому, такое совпадение величин  $E_a$  для разных белков и разных типов тушения неслучайно и отображает вероятность возникновения равновесных структурных флуктуаций в белковой глобуле, позволяющих взаимодействовать с внутренним хромофором как внешнему тушителю, так и тушащим группам самого белка.

*Параметры тушения флюоресценции тетрамерного мелиттина ионами I<sup>-</sup>*  
*Parameters of tetra-dimensional melittin fluorescence quenching by ions*

$t, ^\circ\text{C}$	$K_{sv}, 1/\text{M}$	$k, 10^9/(\text{M}\cdot\text{c})$
15	8,1	2,8
24	7,8	3,1
40	7,6	3,9
60	5,5	5,6

*О других способах описания температурной зависимости флюоресцентных параметров.* В ряде работ Э. А. Бурштейна и др. [7, 14, 15] обосновывается альтернативный аррениусовому способ описания температурных зависимостей различных флюоресцентных параметров. Он основан на предположении о том, что динамика белковых групп, включая и внутренние, зависит от коэффициента диффузии растворителя, и, следовательно, ряд флюоресцентных параметров пропорционален  $T/\eta$  ( $\eta$  — вязкость растворителя).

Для того чтобы определить, применим ли такой подход для мелиттина и является ли его внутримолекулярная подвижность «активационной», либо «диффузионной», необходимо было существенно изменить вязкость. Однако оказалось, что при добавлении различных вискогенов, таких как глицерин, этиленгликоль и сахароза (последние данные не представлены), спектр флюоресценции тетрамерного мелиттина сдвигается в коротковолновую область (рис. 4). При этом сдвиг наблюдается как при нормальном, так и при краевом возбуждении, а величина краевого сдвига остается неизменной. Отметим, что эти спектральные изменения наблюдаются в диапазоне замедленной дипольно-ориентационной релаксации ( $t = 17$  °С) и, следовательно, не могут объясняться дальнейшим увеличением  $\tau_R$ , а связаны с изменением структуры микроокружения триптофанила. То есть действие названных веществ на мелиттин не исчерпывается одним лишь эффектом вязкости, что делает некорректным их применение для решения вопроса о характере равновесной внутримолекулярной динамики мелиттина. Решение вопроса о конкретизации наблюдаемого изменения структуры сольвата триптофанила в мелиттине, а также об универсальности действия названных вискогенов на белки требует дальнейшего изучения.

На основании проведенной работы можно сделать следующие выводы.

1. На примере мелиттина проведено сопоставление количественных результатов расчета параметров дипольно-ориентационной динамики окружения триптофанила, полученных методами стационарной спектроскопии краевого возбуждения и спектроскопии с временным разреше-

нием. Показано, что метод красного краевого возбуждения флюоресценции, являясь более доступным в методическом отношении, позволяет получать адекватную информацию о динамике белка.

2. Как показали эксперименты на мелиттине при низких температурах, использование метода краевого возбуждения флюоресценции **даже для качественной** оценки внутрибелковой динамики требует контроля однородности основного состояния хромофоров **даже** в популяции молекул **однотриптофанового** белка.

3. В тетрамерном мелиттине не происходит межтриптофанового безызлучательного переноса энергии возбуждения, сопровождающегося потерей энергии.

4. Величина энергии активации равновесных структурных флуктуаций в тетрамерном мелиттине, позволяющих взаимодействовать с триптофаном как внешнему тушителю, так и тушащим группам самого белка, составляет 10÷15 кДж/моль. Энергия активации реориентации внутренних дипольных групп мелиттина выше — 30 кДж/моль.

5. При изучении влияния вязкости растворителя на внутримолекулярную подвижность белка (на примере триптофанила тетрамерного мелиттина) показано, что добавление в раствор различных вискозенов (глицерин, этиленгликоль, сахароза) приводит к изменению структуры микроокружения внутренних аминокислотных остатков белка. То есть действие названных веществ не исчерпывается одним лишь эффектом вязкости.

Автор глубоко признателен Е. Г. Костржевской за предоставленный для исследования мелиттин; А. П. Демченко — за постоянное внимание к работе, а также А. И. Корнелюку и Б. Шомоди — за помощь, оказанную при проведении и обсуждении эксперимента. Автор считает своим приятным долгом выразить особую благодарность Э. А. Бурштейну за многочисленные ценные замечания и советы.

#### EQUILIBRIUM DYNAMICS OF PROTEIN. STUDIES IN PROPER FLUORESCENCE OF MELITTIN

*A. S. Ladokhin*

A. V. Palladin Institute of Biochemistry,  
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

#### Summary

Structural-dynamic organization of melittin molecule has been studied in detail within a wide temperature range. Spectral changes of proper fluorescence for tetra-dimensional melittin observed at low temperatures depend on dissociation rather than on variations in mobility of dipoles as at high temperatures. The previously obtained values of parameters for dipole-orientation mobility of tryptophanyl surroundings are refined. It is shown that value of activation energy of equilibrium structural fluctuations in tetra-dimensional melittin permitting both external quenching agent and quenching groups of protein itself to interact with tryptophanyl equals 10-15 kJ/mol. Reorientation activation energy of internal dipole melittin groups is 30 kJ/mol.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Демченко А. П., Костржевская Е. Г. Мелиттин: структура, свойства, взаимодействие с мембраной // Укр. биохим. журн.— 1986.— 58, № 5.— С. 92—103.
2. Структурно-динамические свойства окружения триптофанового остатка в мелиттине / А. П. Демченко, А. С. Ладохин, Е. Г. Костржевская, Т. Л. Диброва // Молекуляр. биология.— 1987.— 21, № 3.— С. 663—671.
3. Demchenko A. P., Ladokhin A. S. Temperature-dependent shift of fluorescence spectra without conformational changes in protein; studies of dipole relaxation in the melittin molecule // Biochim. et biophys. acta.— 1988.— 955, N 3.— P. 352—360.
4. Камалов В. Ф., Ладохин А. С., Толугаев Б. Н. Наносекундная внутримолекулярная динамика мелиттина // Докл. АН СССР.— 1987.— 296, № 3.— С. 742—745.
5. Наносекундная динамика белка мелиина: флуоресцентная спектроскопия с временным разрешением / П. Гершман, А. С. Ладохин, Н. В. Лебедева, А. Ю. Чикишев // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 3.— 1989.— 30, № 3.— С. 47—52.

6. *Permyakov E. A., Burstein E. A.* Relaxation processes in frozen aqueous solution in proteins; temperature dependence of fluorescence parameters // *Stud. biophys.*— 1975.— 51, N 2.— P. 91—103.
7. *Бурштейн Э. А.* Собственная люминесценция белка (природа и применение).— М.: ВИНТИ, 1977.— 190 с.— (Итоги науки и техники. Сер. Биофизика: Т. 7).
8. *Brown L. R., Lauterwein J., Wuthrich K.* High-resolution H-NMR studies of self-aggregation of melittin in aqueous solution // *Biochim. et biophys. acta.*— 1980.— 622, N 2.— P. 231—234.
9. *Демченко А. П., Ладохин А. С.* Флуоресцентная спектроскопия краевого возбуждения индола и триптофана // *Биополимеры и клетка.*— 1988.— 4, № 4.— С. 211—217.
10. *Demchenko A. P., Ladokhin A. S.* Red-edge-excitation fluorescence spectroscopy of indole and tryptophan // *Eur. Biophys. J.*— 1988.— 15, N 2.— P. 369—379.
11. *Демченко А. П.* Люминесценция и динамика структуры белков.— Киев: Наук. думка, 1988.— 280 с.
12. *Talbot J. C., Faucon J.-F., Dufourcq J.* Different states of self-association of melittin in phospholipid bilayers. A resonance energy transfer approach // *Eur. Biophys. J.*— 1987.— 15, N 1.— P. 147—157.
13. *Tran C. D., Beddard G. S.* Studies of the fluorescence from tryptophan in melittin // *Ibid.*— 1985.— 13, N 1.— P. 59—74.
14. *Bushueva T. L., Busel E. P., Burstein E. A.* Some regularities of dynamic accessibility of buried fluorescent residues to external quenchers in proteins // *Arch. Biochem. and Biophys.*— 1980.— 204, N 1.— P. 161—166.
15. *Bushueva T. L., Busel E. P., Burstein E. A.* Relationship of thermal quenching of protein fluorescence to intramolecular structural mobility // *Biochim. et biophys. acta.*— 1978.— 534, N 1.— P. 141—152.

Ин-т биохимии им. А. В. Палладина АН УССР, Киев

Получено 17.01.90

---

ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКОВА ДУМКА» В 1990 г. ВЫПУСТИТ В СВЕТ КНИГУ:

**ХОУКИНС Д. Ж. СТРУКТУРА И ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ / Под. ред. В. К. Кибирева:**  
Пер. англ.— Киев: Наук. думка, 1990 (IV).— 12 л.: ил.— ISBN 5-12-001816-5 (в пер.):  
2 р. 60 к.

В монографии представлена методология генетической инженерии. Описаны исследования, характеризующие связь генезиса рака с определенным семейством вируса.

Для генетиков, биохимиков, молекулярных биологов, студентов вузов.